



**Espacenet**

# Bibliographic data: JP 2007508342

(T)

## MODERATING THE EFFECT OF ENDOTOXINS

Publication date: 2007-04-05

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification: - international: A23L1/28; A23L1/30; A61K35/12; A61K36/06; A61K38/00; A61K39/39; A61K9/14; A61P1/00; A61P1/04; A61P1/12; A61P31/04  
- European: A61K36/06

Application number: JP20060534671T 20041013

Priority number (s): EP20030023015 20031013. WO2004EP11470 20041013

Also published as:  
 • WO 2006039609 (A2)  
 • WO 2006039609 (A3)  
 • US 2008282171 (A1)  
 • US 2010028316 (A1)  
 • EP 1688417 (A2)  
 • 05028

**Abstract not available for JP 2007508342 (T)**

**Abstract of corresponding document: WO 2005039609 (A2)**

The present invention relates to the use of an oral composition comprising yeast extract, in the manufacture of an oral composition to treat the effects of infection by pathogenic bacteria such as *Clostridium difficile*. Such effects may include the failure of the integrity of the gut epithelial cells and diarrhea as well as other CDX-2 mediated effects.

Last updated: 28.04.2011 Worldwide Database 5.7.22: 93p

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-508342

(P2007-508342A)

(43) 公表日 平成19年4月5日 (2007.4.5)

(61) Int. Cl.

F 1

テーマコード (参考)

A 6 1 K 36/06 (2006.01)

A 6 1 K 35/72

4 B 0 1 8

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 P 31/04

4 C 0 7 6

A 6 1 P 1/12 (2006.01)

A 6 1 P 1/12

4 C 0 8 4

A 6 1 P 1/04 (2006.01)

A 6 1 P 1/04

4 C 0 8 5

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 37/02

4 C 0 8 7

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特表2006-534671 (P2006-534671)

(71) 出願人 599132904

(86) (22) 出願日 平成16年10月13日 (2004.10.13)

ネステク ソシエテ アノニム

(85) 翻訳文提出日 平成18年6月5日 (2006.6.5)

スイス国、ブベリ、アプニユー ネスレ

(86) 国際出願番号 PCT/EP2004/011470

5 5

(87) 国際公開番号 WO2005/039609

(74) 代理人 100066692

(87) 国際公開日 平成17年5月6日 (2005.5.6)

弁理士 浅村 皓

(31) 優先権主張番号 03029015.5

(74) 代理人 100072040

(32) 優先日 平成15年10月13日 (2003.10.13)

弁理士 浅村 肇

(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(74) 代理人 100102897

弁理士 池田 幸弘

(74) 代理人 100088926

弁理士 長沼 順夫

(72) 発明者 コーテシートゥラ、 イレーヌ

スイス国、エバランジェ シェマン デュ

ボルニー 34セ

最終頁に続く

(54) 発明の名称 エンドトキシンの作用の緩和

(57) 【要約】

本発明は、クロストリジウムディフィシル (*Clostridium difficile*) などの病原菌による感染の作用を治療するための経口組成物の製造における酵母抽出物を含む経口組成物の使用に関する。こうした作用には、腸上皮細胞の完全性障害及び下痢並びに他の C O X - 2 媒介作用が含まれていることがある。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

エンテロトキシン産生病原体による感染の作用を治療するための、経口組成物の製造における酵母抽出物の使用。

## 【請求項 2】

作用が、腸管上皮の完全性障害、下痢及び他の C O X - 2 媒介作用を含む、請求項 1 に記載の使用。

## 【請求項 3】

病原体が、クロストリジウムディフィシレ (*Clostridium difficile*)、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)、大腸菌 (*E. coli*)、熱帯リーシュマニア (*Leishmania donovani*)、コレラ菌 (*Vibrio cholera*)、鼠チフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、シングラエ (*Shingellae*)、アエロモナスヒドロフィラ (*Aeromonas hydrophila*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、及び又は毒素原性バクテロイデスフラジリス (*enterotoxigenic Bacteroides fragilis*) である、請求項 1 又は 2 に記載の使用。

## 【請求項 4】

経口組成物が 0.01 ~ 0.5 体積% の酵母抽出物を含む、前記請求項のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 5】

経口組成物が好ましくは 0.3 ~ 7 体積% の量でペプトンをさらに含む、前記請求項のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 6】

ペプトンが、平均ペプチドサイズが 5 アミノ酸以下の乳清タンパク質の加水分解産物である、請求項 5 に記載の使用。

## 【請求項 7】

経口組成物が好ましくは 0.3 ~ 7 体積% の量で肉抽出物をさらに含む、前記請求項のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 8】

経口組成物が薬物療法に対するアジュバントである、前記請求項のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 9】

経口組成物が乳児用調製粉乳又は経腸組成物である、前記請求項のいずれかに記載の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、病原体による感染の結果として生じるエンテロトキシンの作用を緩和するための栄養手法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ヒト及び動物の胃腸管は、とりわけ、老化、ウイルス、細菌及び又はそれらの毒素或いは暴行及び薬物乱用が原因のものを含む、様々な障害を生じるリスクがある。

## 【0003】

様々な胃腸障害の徴候を軽減し得るいくつかの要因又は治療法がある。とりわけ、微生物叢として知られている常在フローラは、腸の環境の調節において重要な役割を果たす。微生物から放出された又は食品成分として食事と一緒に摂取された前生物学的分子と共にプロバイオティックスとして知られている腸に住んでいる非病原性微生物は、*C. ディフィシレ* (*C. difficile*) 感染を含む胃腸障害を予防又は治療する潜在的な手段を

10

20

30

40

50

与える。

#### 【0004】

ヒト腸内細菌は、腸内におけるC. ディフィシル毒素Aの産生を調節し、毒素Aは、従来のマウスよりも無菌マウスから単離した腸膜により結合することが実証されており、これは、常在微生物がC. ディフィシルの病原性に重要な役割を果たすことを示している。C. ディフィシル誘導大腸炎及び下痢を治療するための栄養手法を試験した臨床研究の結果、乳酸菌GG (*Lactobacillus GG*) が入院している成人又は乳児における大腸炎の徴候を改善することが示されている。同じ方法で、非病原性酵母菌サッカロミセスボウラディ (*Saccharomyces boulardii*) は、成人又は乳児におけるC. ディフィシル誘導大腸炎及び下痢の予防又は治療に明白な効果があることが示されている。さらに、ロシア特許RU2168915号は、子供及び病弱な人々における腎臓障害に対する治療又は予防食品として、所定の割合で牛肉、豚肉、湯通した牛のレバー、カボチャ又はペポカボチャ、及びバターを含む肉製品の使用を開示している。上記のすべての報告は、C. ディフィシル感染に対する栄養介入の分野が依然として開かれていることを示している。

10

#### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0005】

本発明は、病原体による感染の結果として生じるエンテロトキシンの作用を治療するための酵母抽出物を含む経口組成物の使用に関する、こうした作用には、アクチンフィラメントの分解による腸管上皮の完全性障害及びその結果として生じる密着帯の破壊、並びに腸液の毒素誘導分泌の結果として生じる下痢及びシクロオキシゲナーゼ誘導によって媒介された他のプロセスがある。

20

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0006】

本出願では、「経口組成物」は、任意の摂取可能な組成物を表すものであり、栄養組成物、栄養補助食品、又は医薬品であってよい。これは、例えば、薬物療法のアジュバントであってもよい。これは、病原体による感染の結果として生じるエンテロトキシンの作用に苦しんでいる乳児又は早産児から高齢者までのヒトに使用するものである。これはまた、病原体による感染の結果として生じるエンテロトキシンの作用に苦しんでいる猫、犬、魚、ウサギ、ネズミ、ハムスターなどのペット、より一般に、馬、牛、ニワトリ、羊など人間によって飼育されている任意の動物を対象としている。

30

#### 【0007】

「酵母抽出物」という用語は、酵母自己消化物の水溶性部分を含んでよく、ビタミンB複合体を含むことが好ましい。これはまた、パン酵母自己消化物の可溶性及び不溶性部分の両方を含む抽出物を包含するものであり、この場合は、さらにリボフラビン及びパントテン酸を含むことが好ましい。しかしながら、本発明の好ましい実施形態では、「酵母抽出物」は、微生物を包含せず、微生物によって産生された酵素を含まない。酵母抽出物は、サッカロミセスセレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) からの抽出物であってよい。本発明で使用するのに適した市販の酵母抽出物の例は、Becton Dickinson and Company社によって供給されているBD Bacto Yeast Extractである。

40

#### 【0008】

「肉抽出物」という用語は、とりわけ、牛、豚、ラム、鶏及び鰯又は七面鳥など任意の肉の抽出物を包含するものである。これは、上記の肉の混合物由来であってもよい。いずれにしても、これは、少なくともミネラル、アミノ酸、及び炭素を供給することになる。本発明で使用するのに適した市販の肉抽出物の例は、Becton Dickinson and Company社によって供給されているBD Bacto Beef Extractである。

#### 【0009】

50

「ペプトン」という用語は、タンパク様物質の部分酵素又は酸加水分解によって得た生成物の任意の可溶性混合物を表す。タンパク質出発物質の選択は重要ではないが、カゼイン、乳糖及び肉タンパク質が好ましい。ペプトンは、3 kDa未満の分子量を有することが好ましい。本発明で使用するのに適した市販のペプトンの例は、Becton Dickinson and Company社によって供給されているBD Bacto Peptoneである。

#### 【0010】

エンテロトキシンは、腸粘膜に作用する細菌毒素である。これらは、病原菌によって腸内に産生され得る。細菌エンテロトキシンは、粘膜及び全身の免疫反応の両方を活性化させる強力な粘膜イムノゲンであり、したがって食中毒、一般的な下痢、大腸炎、慢性炎症及び赤痢を含む様々な疾患の原因である。エンテロトキシンはまた、重篤な粘膜潰瘍、出血性炎症性腸炎又は血性下痢を生じる。毒素誘導疾患は、しばしば腹部の痙攣及び直腸痛を伴う。エンテロトキシンは、体液分泌及び腸炎症の主要な刺激物質である。それらの上皮細胞への結合により、線維状アクチンの非分離及び密着帯の透過性の増大並びに細胞内経路及び後続の合成及び体液分泌活性化物質の放出の活性化が生じる。毒素はまた、感覚神経の活性化及び感覚神経ペプチドの放出、それに続くサイトカインの放出及び上皮細胞破壊を経て、通常粘膜中の好中球の遊出及び腸細胞壊死を特徴とする重篤な炎症を誘導する。

#### 【0011】

病原菌は、共生マイクロフローラの一部であってよく、即ち、例えば、抗生物質、特に広域抗生物質を用いた治療中に起こり得るようにマイクロフローラのバランスが乱されない場合、及び乱されるまでも影響なく腸内に存在し得る。このような場合には、これらの「日和見病原体」は、急速に増殖し、腸マイクロフローラの支配に及び、腸炎を引き起こす毒素を産生する可能性がある。こうした細菌の例には、クロストリジウムディフィシレ (*Clostridium difficile*) 及びウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) があり、本発明の組成物は、こうした細菌によって産生された毒素の作用を治療するのに特に適している。したがって、本発明は、院内感染の治療に使用するのに特に適していることが理解されよう。

#### 【0012】

他のエンテロトキシン産生細菌の例は、大腸菌 (*E. coli*)、熱帯リーシュマニア (*Leishmania donovani*)、コレラ菌 (*Vibrio cholera*)、鼠チフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、シングラエ (*Singella*)、アエロモナスヒドロフィラ (*Aeromonas hydrophila*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、又は毒素産生性バクテロイデスフラジリス (*enterotoxigenic Bacteroides fragilis* (ETBF)) である。

#### 【0013】

クロストリジウムディフィシレ感染は、抗生物質の摂取によって腸の微生物叢が変化した入院患者の大腸炎及び下痢の主な原因である。C、ディフィシレは、2種類のエンテロトキシン：毒素A及び毒素Bを放出することによって腸炎を引き起こす。どちらの毒素もヒトに対して強力な細胞毒性をもつが、毒素Aが体液分泌（したがって下痢）及び腸の炎症の主要な刺激物質である。毒素Aは、上皮細胞の表面に結合し、被覆小窩で細胞質中に内部移行する。内部移行は、アクチン束力繊維の分解、アクチン関連付着帯の破壊、密着帯の開口、細胞剥離及び体液分泌の増大をもたらす。これらの作用は、培養ヒト上皮細胞系、例えばT84結腸細胞系で *in vitro* で実証されており、この場合、単層への毒素Aの添加により経路上皮抵抗が減少し、単層の透過性が増大した。 *in vivo* におけるC、ディフィシレエンテロトキシンは、モルモット、ウサギ又はラットの回腸を毒素Aに曝露した場合、粘膜中の好中球の遊出及び腸細胞壊死を特徴とする重篤な炎症を誘導することがわかっている。この急性炎症反応をもたらすメカニズムは、感覚神経の活性化及び感覚神経ペプチドの放出であると思われる。最近の研究は、毒素Aが腸内のCOX

…2の発現を上向き調節することも提案した。

【0014】

腸の病原体が原因の障害の最も一般的な結果は下痢である。下痢は、病原体（エンテロトキシン産生細菌を含む）、寄生虫又はウイルスによって誘導され得る腸内の上皮細胞からの分泌が増大した結果である。

【0015】

COX-2は、アラキドン酸からのプロスタグランジンの合成を触媒する酵素である。COX-2の知られている他の基質には、それぞれPGE<sub>1</sub>及びPGE<sub>2</sub>を産生するジホセーγ-リノレン酸（20:3n:6）及びエイコサペンタエン酸（EPA、20:5n:3）がある。ヒトCOX-2遺伝子はクローン化されており、そのゲノムマップ並びにそのcAMP、NF-κB及びTGf-β、IL-1又はTNF-αなど異なる成分への遺伝子発現の応答性が説明されている。

【0016】

COX-2は、アレルギー反応及び腸の炎症を含む多くの炎症に関連している。腸の炎症及び障害の中で、COX-2活性が関与しているのは、胃炎、炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、又は腸癌である。

【0017】

酵母抽出物は、体積で0.01～0.5%の酵母抽出物を含む経口組成物の形で投与することが好ましい。さらに、この組成物は、好ましくは0.3～7%でペプトンを含んでいてよい。ペプトンの適当な供給源には乳清タンパク質があり、平均ペプチドサイズが5アミノ酸以下の高度に加水分解した乳清タンパク質が特に好ましいが、加水分解の程度が15～20%の乳清タンパク質も使用することができる。肉タンパク質はペプトンの代替供給源であり、肉タンパク質の中では牛肉タンパク質が好ましい。この組成物はまた、肉抽出物を、好ましくは0.3～7.0体積%の量で含んでいてもよい。好ましい実施形態では、経口組成物は、（体積で）0.5%の酵母抽出物、1%の肉抽出物及び1%のペプトンを含む。

【0018】

本発明の経口組成物は、様々な異なる食品の形態を取ることができる。例えば、機能的集団が乳児集団の場合、乳児用調製粉乳であってよい。これは、スープなどの脱水食品であってもよい。これは、さらに経腸組成物又は栄養補助剤であってよい。腸の障害に苦しんでいる個体がペットの場合、経口組成物は、任意のウェット又はドライペットフードであってもよい。

【0019】

本発明による組成物を医薬品に混合する場合、任意の適切な賦形剤と一緒に混合して任意の医薬形態にすることができる。

【0020】

酵母抽出物を摂取することによって、腸上皮の完全性障害及び下痢などの腸の障害からも明らかのように病原体による感染に苦しんでいる個体は、同じ障害をもつが、酵母抽出物を補充していない食餌を収めている個体と比較して、体液分泌が正常化し、細胞構造がより損傷を受けず、且つ炎症が低減することを発見した。

【0021】

本発明の枠内では、腸の不調、損傷及びストレスを受けた個体が腸の完全性に改善された作用を得られるように、ペプトン及び／又は肉抽出物は酵母抽出物を伴っていてもよい。

【実施例】

【0022】

以下の実施例は、本発明の範囲に含まれる製品の一部分及びそれらを作製する方法を例示したものである。それらは、決して本発明を限定するものと考えべきではない。本発明に関して修正及び変更を行うことができる。即ち、当業者は、種々の応用のために本発明の化合物の天然に存在するレベルを合理的に調整するため、これらの実施例中の多くの変

10

20

30

40

50

形形態が広範な処方、成分、処理、混合物を含むことを認識するはずである。

【0023】

(実施例1)

密着帯及びアクチンフィラメントへの組成物の作用

原料と方法

ヒト結腸癌細胞系T84(ATCC、CCL-248)を、20%FBS(ウシ胎児血清)、2mMグルタミン及び100U/mlペニシリンーストレプトマイシンで補充したDMEM(F12 1:1中で培養した、ヒト初代皮膚線維芽細胞を、10%FBS及び100U/mlペニシリンーストレプトマイシンで補充したDMEM中で培養した)。

【0024】

T84単層を $0.5 \times 10^5$ 細胞/インサートで6穴インサートプレートに播種し、3週間培養した。TEER(経上皮電気抵抗)の基底値を測定し、培地を、de Man-Rogosa-Sharpe増殖培地(以下「MRS」と呼ぶ、1%牛肉抽出物及び1%肉ペプトンと共に0.5%酵母抽出物をPBS中に含む溶液)の20%溶液と交換した。37℃で1h後、C、ディフィシル毒素Aを100ng/mlの最終濃度で単層の先端側に加え、37℃で1、2、4、6及び24h後にTEERをさらに測定した。対照の単層は培地にだけ曝露した。各条件で3通りのインサートを用いた。各時点で、1mlの先端及び1mlの基底外側の培地を捕集し、製造業者の使用説明書に従って細胞毒性検出キットを用いてLDH放出を測定することによって細胞生存度を評価した。

【0025】

T84細胞又はヒト初代線維芽細胞( $2 \times 10^5$  チャンバー)を4チャンバースライドガラスに播種し、前述のように増殖させ、20%MRS溶液で1hインキュベーション後、毒素Aを最終濃度500ng/mlに加えた。6h後、細胞をPBSで洗浄し、3、7%パラホルムアルデヒドで固定し、PBSで2回洗浄し、アセトンを用いて-20℃で5分間透過処理し、PBS-1%BSA(ウシ血清アルブミン)で処理して非特異的標識を低減させた。アクチン非分離及び細胞の球体化を、200U/mlローダミン標識ファロトキシンで標識付けした後蛍光顕微鏡によって評価した。

【0026】

結果

毒素Aは、上皮細胞の密着帯に影響し、それは上皮単層の経上皮電気抵抗(T<sub>TEER</sub>)の低下によって測定される作用である。MRSが毒素Aの病原性を相殺できるかどうか評価するために、T84単層を組成物の存在下又は不在下に毒素Aに曝露し、TEERを測定した。100ng/mlの毒素AをT84単層に加えた結果、6hのインキュベーション後にTEER対照値が3分の1に低下した( $309 \pm 8$  対  $985 \pm 49 \Omega \text{cm}^2$ )、20%MRS溶液を毒素Aと一緒に加えることにより、TEER低下が抑制された( $140 \pm 3$  対  $95$  対  $309 \pm 8 \Omega \text{cm}^2$ )が、T84細胞の基底TEER値は変化しなかった( $1217 \pm 277 \Omega \text{cm}^2$  対  $985 \pm 49 \Omega \text{cm}^2$ )。細胞生存度の変化は観察されず、毒素Aが6hの期間中に細胞死を誘導しないことが示唆された。上記の結果は、酵母抽出物と、ペプトン及び肉抽出物との混合物によって毒素Aが相殺され、T84単層の毒素A誘導TEER低下が妨げられ得ることを実証している。

【0027】

毒素A誘導TEER低下に対するMRSの保護作用が細胞の球体化をもたらす細胞骨格の変化と相関関係にあったかどうかを明らかにするために、T84細胞を毒素A単独で又は20%MRS溶液と併せて処理し、細胞骨格アクチンを免疫細胞化学によって分析した。500ng/mlの毒素Aを加えることによってT84細胞の球体化が誘導され、それは、アクチン非分離、及びバックゲーミングにより細胞単層が蜂の巣形を示すことによって証明されている。20%MRS溶液を毒素Aと併せて加えることにより、毒素Aによって誘導されるアクチン非分離とその後の細胞の球体化が一部妨げられるが、単独で加えた場合、細胞の細胞骨格に影響を及ぼさなかった。これらの作用は、T84単層の空間配置によってほとんど見えなかった。判断をより容易にするために、平面単層を形成する初代ヒ

10

20

30

40

50

ト皮膚線維芽細胞を用いて実験を繰り返した。毒素Aの存在下で6h後に、すべての線維芽細胞が、完全な細胞骨格の破壊を示唆する球状の外観を示した。20% MRS 溶液を毒素Aと併せて加えることにより、アクチン非分離及び細胞の球体化が一部妨げられた。毒素Aと20%の組成物で処理した線維芽細胞の形状は似ていたが、対照線維芽細胞又は組合せ単独で処理した線維芽細胞の形状とは同一ではなかった。したがって、MRSは、アクチン非分離による細胞骨格変化とその後の細胞の球体化を一部妨げて毒素Aを相殺することができる。

【0028】

次いで、20% MRS 溶液の代わりに0.5%酵母抽出物溶液の20%溶液を使用してこれらの実験を繰り返した。

【0029】

20% MRS 溶液と同様の結果が得られた。

【0030】

考察

ここで観察された保護作用のメカニズムははっきりと解明されておらず、おそらく多種多様である。毒素Aは、アクチンフィラメントの重合を誘導し、細胞骨格アクチンの非分離をもたらす。アクチン破壊は、*in vitro*で観察される細胞の球体化、及び密着帯の透過性の増大の原因である。アクチンに対する毒素Aの作用は、タンパク質のRhofamirineに対するそのグルコトランスフェラーゼ活性によるものである。毒素Aは、グルコシル残基をUDPグルコースからRho、Rac及びCdc42のストロニオン37へ酵素的に転移させることができ、アクチン張力繊維の分解、アクチン関連付着板の破壊、密着帯の開口、細胞剥離及び体液分泌の増大をもたらす。それらの作用は、T84細胞で*in vitro*で実証されており、この場合、単離した毒素Aの添加により、上皮細胞中のRhoタンパク質の改変が原因で経上皮抵抗が減少し、単離の透過性が増大した。したがって、我々は、酵母抽出物が、Rhoタンパク質のシグナル伝達経路に干渉し、毒素Aの作用を阻害すると考える。特定の理論に拘泥するものではないが、この干渉は、グルコシル残基のRhoタンパク質への転移の上流又は下流であってよい。

【0031】

(実施例2)

エンテロトキシンを産生する胃腸病原体が原因の損傷に対する組成物の作用

原料と方法

6週齢の雄マウスを、腸の微生物叢を排除するために60mg/L ゲンタマイシン、250mg/L ペンコマイシン、300mg/L アモキシシリン及び10mg/L アンホテリンで1週間適宜処理した。次いでマウスを3つのグループ：i) 対照グループ；ii) 適宜20% MRS 溶液を溶かした飲料水を1週間与えたグループ；及びiii) 2日おきに組成物500µlを2回胃管栄養によって与えたグループに分けた。処理が終了した次の日、30mg/kg 体重のナトリウムペントバルビタールで動物に麻酔をかけ、手術の全所要時間にわたって0.8~3% イソフルオラン麻酔下で暖かい毛布(37℃)の上に置いた。腹部を正中切開によって開き、空腸の末端を露出させた。5cmの空腸セグメント2個の各末端を手術糸で2重に結紮させて、それらの間に2cmの距離がある腸ループを2重形成した。一方のループには、対照としてPBS 600µlを注射し、もう一方には、毒素Aを20µg含有するPBS 600µlを注射した。次いで腸ループを腹腔に戻し、切開部を縫合して閉じた。マウスを回復させ、継続的に経過を観察した。動物を4h後に安楽死させ、ループを単離し、それらの質量対長さ比(mg/cm)を記録して体液分泌を評価した。次いでループを氷冷PBSで2回洗浄し、RNA lysis buffer (高濃)中に浸し、液体窒素中で瞬間冷凍し、-80℃で保存した。

【0032】

結果

下痢及び大腸炎をもたらすC. ディフィシレ感染は、病院及び高齢者宅でほとんど発生して抗生物質を摂取している患者を襲い、それによって彼らの腸の微生物叢が変化する。



本発明の組成物及びその成分が *in vivo* で毒素 A の作用を相殺できるかどうかを評価するために、マウスモデルを使用した。ヒトの C、ディフィシル感染を誘発する条件を模倣するために、マウスを、それらの腸の微生物叢を変化させることを目的とした抗生物質で 1 週間処理した。抗生物質処理が終了した次の日、あるグループのマウスに適宜 2.0 % MRS 溶液を 1 週間与えた。この期間の終了時、腸ループを形成し、PBS 又は毒素 A を注射した場合に PBS 注射ループと比較して体液分泌の増大を示した ( $12.1 \pm 9.3$  ml,  $7.6 \pm 6.4$ ,  $6.6 \pm 1.3$ ,  $5 \text{ mg} / \text{cm}$ )。対照的に、1 週間 MRS を与えられたマウスでは、毒素 A 又は PBS を注射したループにおいて体液分泌の違いは観察されなかった ( $7.3 \pm 8$ ,  $6 \pm 8$ ,  $3.6 \pm 6$ ,  $8 \pm 10$ ,  $8 \text{ mg} / \text{cm}$ )。マウスに 2 回投与で 2.0 % MRS 溶液 500  $\mu$ l を胃管栄養によって与えた場合、類似の結果が得られた。これらの結果は、ペプトン及び肉抽出物と共に酵母抽出物を用いた処理が、腸の微生物叢の欠陥を示している対象において毒素 A の悪影響を抑制できることを示している。

#### 【0033】

組成物が毒素 A の直接的な不活性化によってその保護作用を発揮するかどうかを確認するために、2.0 % MRS 溶液、又は対照としての PBS を毒素 A と 1 h 混合してから、この混合物を 1 週間抗生物質で処理したマウスの腸ループに注射した。対照 (PBS) と MRS 注射ループの間に毒素 A 誘導体液分泌のレベルで有意差は記録されなかった。この結果は、組成物が直接的な結合及び毒素の不活性化によって毒素 A の作用を相殺せず、そのため毒素結合エポトープの毒素切断又はマスキングがもたらされ得ることを示唆している。

#### 【0034】

##### 考察

MRS 組成物は、毒素 A によって誘導される腸液分泌からマウスを保護した。特定の理論に拘泥するものではないが、我々は、毒素 A を切断する酵母抽出物の保護作用が、2 つの主な理由で酵素活性によるものではないと考える：i) 使用した溶液は常に、溶液中に含まれるプロテアーゼなど任意の酵素の非活性化をもたらすオートクレーブにかけており、ii) マウスの腸ループに注射する前に毒素 A と一緒に混合及びインキュベートした組成物は、腸液分泌を阻害できなかった。したがって、酵母抽出物の保護活性は、腸上皮細胞上の毒素 A 受容体に結合し、毒素 A の結合及び関与しているシグナル伝達経路の活性化を妨げる溶液中の自由分子 (例えばアミノ酸又はペプチド) の存在によるものであると我々は考える。

#### 【0035】

##### (実施例 3)

##### COX-2 発現に対する組成物の作用

##### 原料と方法

実施例 2 に記載されているものと同一手順を使用した。RNA をマウス腸ループから抽出し、COX-2 mRNA 発現を RT-PCR によって評価した。Superscript II (登録商標) 酵素 200 U を用いて全 RNA (1  $\mu$ g) を逆転写した。5'-CAGAGTACACTACATCTGAC-3' をセンス、5'-TCTCTCGCTTCTGATTCGTCTTG-3' をアンチセンスプライマーとして用いて PCR によってマウス COX-2 の 400 bp 断片を増幅した。5'-ATGAGGTAGTCTGTCAGGT-3' をセンス、5'-ATGGATGACGATATCGCT-3' をアンチセンスプライマーとして用いて同じ RT ミックスから内部標準として用いた  $\beta$ -アクチンの 700 bp 断片を増幅した。DNA 混入を排除するために、RNA 試料に PCR を直接行った。PCR 産物を 1 % アガロースゲルに添加し、撮影し、写真をバンド強度の定量化による濃度測定に使用した。内部標準  $\beta$ -アクチンの発現に対して標準化を行った：COX-2 と対応する  $\beta$ -アクチンの mRNA シグナルの比を決定し、任意スコア 1 を割り当てた「無処理試料」(水を与えて PBS を注射した) のものを基準として示した。

## 【0036】

## 結果

毒素A媒介体液分泌に關与していることが知られているCOX-2が組成物の保護作用にも關係しているかどうかを明らかにするために、COX-2 mRNA発現をRT-PCRによって評価した。異なる処理によるCOX-2発現の変化を、 $\beta$ -アクトチンを基準として示した。対照マウスの腸ルーブ中に毒素Aを20  $\mu$ g注射した結果、COX-2 mRNA発現が3.6倍増大した。マウスをMRS組成物で1週間処理した結果、毒素Aによって媒介されたCOX-2増大が2分の1に低下した。毒素Aによって誘導された腸のCOX-2発現は、酵母抽出物処理下では2.3分の1に低減した。MRSも酵母抽出物も単独ではCOX-2 mRNA発現の基底レベルを著しく改変していない。胃管栄養によって投与した場合、MRS及びその成分酵母抽出物は単独で、毒素Aによって誘導されたCOX-2 mRNAの増大を相殺することも可能であった。

10

## 【0037】

## 考察

毒素Aが上皮細胞上に結合するとき、好中球遊走及び腸細胞壊死及び炎症の破壊を含む炎症を誘導することがわかってい。これらの作用は、基質P及びカルシトニン遺伝子関連ペプチドなどの感覚神経ペプチドの放出によって媒介され、その後感覚腸神経が活性化される。さらに、腸上皮におけるSPの受容体であるNK-1Rの発現は、C. デイフィシレに感染した動物とヒトの両方で著しく増大する。最近の研究では、C. デイフィシレの毒素Aが腸内のCOX-2の発現を上向き調節することも提案されている。COX-2は、腸液分泌を増大させ、下痢を生じさせることで知られている薬剤であるプロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)の合成を媒介するシクロオキシゲナーゼ酵素の誘導アイソフォームである。特定の理論に拘泥するものではないが、我々は、酵母抽出物がこれらの経路のいずれかを阻害し毒素Aを相殺すると考える。我々の結果は、酵母抽出物が、腸の毒素媒介COX-2誘導を阻害することを示唆している。これは、我々の溶液がその腸受容体への毒素の結合を阻害又は低減する場合にCOX-2活性化をもたらす毒素A媒介シグナル伝達の阻害による可能性がある。

20

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP2004/011470

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K35/72 A61P1/00 //(A61K35/72,35:12)		
According to international Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base used, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to claim No.
X	US 2002/155126 A1 (NAKAMURA TOMOHIKO ET AL) 24 October 2002 (2002-10-24) paragraph '0031!; claims	1,2,9
Y	US 5 665 352 A (BLEHAUT HENRI ET AL) 9 September 1997 (1997-09-09) the whole document	3-8
Y	US 4 643 897 A (GAYRAL PHILIPPE G ET AL) 17 February 1987 (1987-02-17) the whole document	1-9
Y	US 4 595 590 A (HUBLOT BERNARD ET AL) 17 June 1986 (1986-06-17) the whole document	1-9
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document claiming the priority of the act which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim(s) or other special reason (see specification) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"I" Inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the applicability but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance to the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance to the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
17 June 2005		24/06/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 6618 Postfach 2 NL - 2280 MV Rijswijk Tel. (+31) 70 340-2549, Tx 31 651 spt nl, Fax: (+31) 70 340-3010		Authorized officer Bayrak, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCI/EP2004/011470

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages.	Relevant to claim No.
Y	<p>CHAPOY P: "TRAITEMENT DES DIARRHEES AIGUES INFANTILES: ESSAI CONTROLE DE SACCHAROMYCES BOULARDII TREATMENT OF ACUTE DIARRHEA IN INFANTS: A CONTROLLED TRIAL OF SACCHAROMYCES BOULARDII" ANNALES DE PEDIATRIE, PARIS, FR, vol. 32, no. 6, June 1985 (1985-06), pages 561-563, XP001022122 ISSN: 0066-2097 the whole document</p>	1-9
Y	<p>KIMMEY M B ET AL: "PREVENTION OF FUTURE RECURRENCES OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE COLITIS WITH SACCHAROMYCES BOULARDII" DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES, PLENUM PUBLISHING CO, US, vol. 35, no. 7, July 1990 (1990-07), pages 897-901, XP008030503 ISSN: 0163-2116 the whole document</p>	1-9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Indicate the Application No.

PCT/EP2004/011470

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002155126 A1	24-10-2002	JP 2001055338 A US 2003118607 A1	27-02-2001 26-06-2003
US 5665352 A	09-09-1997	FR 2711528 A1 CA 2118374 A1 DE 4437725 A1 GB 2283676 A, B	05-05-1995 26-04-1995 27-04-1995 17-05-1995
US 4643897 A	17-02-1987	EP 0195870 A1 AT 49884 T DE 3575671 D1	01-10-1986 15-02-1990 08-03-1990
US 4595590 A	17-06-1986	AT 42466 T DE 3569673 D1 EP 0149579 A2	15-05-1989 01-06-1989 24-07-1985

## フロントページの続き

(51)Int. Cl.

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	35/12	(2006.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	9/14	(2006.01)	A 6 1 K	9/14	
A 6 1 K	39/39	(2006.01)	A 6 1 K	39/39	
A 2 3 L	1/28	(2006.01)	A 2 3 L	1/28	A
A 2 3 L	1/30	(2006.01)	A 2 3 L	1/30	A

(81)指定国 AP(BW, GH, GN, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LI, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GH, GG, GN, HR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SV, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 フォトブロス、グリゴリオス

スイス国、ロモント、 ルウトウ ドウ ラ コンドミン 6

(72)発明者 ベルゴンツェリ、ガブリエラ

スイス国、ブッサンジー … プレ ローザンヌ、 シュマン ドウ グランヴィニユ 4 4

Fターム(参考) 4B018 MD70 MD71 MD81 MA14 MF01 MF10

4C076 AA17 AA29 CC16

4C084 AA02 PA03 BA44 CA38 DC50 MA02 MA22 MA43 MA52 MA56

NA14 ZA68

4C085 AA38 CC21 CC26 EE03 EE06 GG08 GG10

4C087 AA01 BB47 MA02 MA52 MA60 ZA68 ZA73